Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 561- 573

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۵۷۳-۵۶۱

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Short Research Paper

Production of nanoliposomes carrying nisin with chitosan coating and evaluation of physical and antibacterial properties of the product against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*

Soheyl Reyhani Poul[1]*- Sakineh Yeganeh[2]- Reza Safari[3]

Received: 2021.09.26
Revised: 2021.10.23
Accepted: 2021.10.26
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., Safari, R. (2022). Production of nanoliposomes carrying nisin with chitosan coating and evaluation of physical and antibacterial properties of the product against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 561-573.

Abstract

Introduction: Nisin is one of the antimicrobial substances that is used today as a preservative in various foodstuffs. It is a bacteriocin comprised of 34 amino acids and a molecular weight of 3.5 Da. With all the benefits of nisin, there are barriers to its use in dairy and protein rich products. One of these barriers is the combination of nisin with fats, proteins and sugars and the consequent reduction of its antibacterial activity. In the food science and industry, the use of the technique of encapsulation and production of liposome is the best possible solution in such cases. Also, by adding an antimicrobial agent such as chitosan to the coating of nanoliposomes, the antibacterial activity of the product may be increased. The aim of the present research was to produce nanoliposomes carrying nisin with (and without) chitosan coating and to evaluate the physical and antibacterial properties against two gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: In this study, four treatments of nanoliposomes carrying nisin (NN), nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.05% ((NN-CH (0.05)), nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.1% (NN-CH (0.1)) and nanoliposomes carrying nisin coated with chitosan 0.5% (NN-CH (0.5)) were prepared and examined in terms of physical properties (average particle size, particle dispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency) and antibacterial activity (against two gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* with two diffusion methods in agar medium and microdilution test). This research was conducted in a completely randomized design and SPSS and EXCEL softwares were used for statistical analysis and drawing of diagram, respectively. Data were analyzed by one-way analysis of variance and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

Results and Discussion: The results showed that the average particle sizein different treatments with each other are significantly different ($P<0.05$) and vary from about 110 to 327nm; Also as the amount of chitosan in the coating increased, the particle size increased ($P<0.05$). This indicates the successful binding of chitosan to the surface of the nanoliposome, which results in the formation of a layer around the nanoliposome and an increase in particle size. Particle dispersity index was recorded less than 0.3 in all treatments and was not related to the amount of chitosan in the coating. With increasing the amount of chitosan in the coating of nanoliposomes, zeta potential increased significantly

1. Former PhD Student, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Sari, Iran.
(*Corresponding Author Email: soheylreyhani@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72715.1097

(P<0.05). This index changed from -55.34 in NN treatment to 53.14 mV in NN-CH (0.5) treatment. In fact, chitosan as a cationic polysaccharide changes the potential to positive values. As the amount of chitosan in coating of nanoliposomes increased, the encapsulation efficiency increased significantly in the treatments (P<0.05); this index increased from 32.19% in NN treatment to 75.14% in NN-CH (0.5) treatment. The results of the antibacterial activity of nisin in two methods of diffusion in agar medium and microdilution test showed that its antibacterial activity increased with nanoencapsulation of nisin with (and without) chitosan coating (p<0.05). Also, with the increase in chitosan concentration, the antibacterial activity of carrier nanoliposomes increased and the highest antibacterial activity was recorded in NN-CH (0.5) treatment (p<0.05). The diameter of the non-growth halo of *Bacillus cereus* against the research treatments (with five concentrations of 2.5 to 25 µg/ml) varied from about 4.5 to 17.5 mm. This amount for *Staphylococcus aureus* was recorded from 2.1 to 26.5 mm. By increasing the concentration of nisin and carrier nanoliposomes, the diameter of the halo of non-growth of both bacteria increased significantly (p<0.05). But an exception was recorded in this case; The diameter of the non-growth halo for *Staphylococcus aureus* in two concentrations of 2.5 and 5 µg/ml of treatments was the same and had no significant difference (p>0.05). The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the examined treatments for *Bacillus cereus* were in the range of 100 to 400 and 200 to 500 µg/ml, respectively. These two concentrations for *Staphylococcus aureus* were recorded as 50 to 200 and 100 to 400 µg/ml respectively. Based on the values of diameter of non-growth halo, MIC and MBC it can be claimed that *Bacillus cereus* is more resistant to the examined treatments than *Staphylococcus aureus*.

Nanoencapsulation of nisin in the form of carrier nanoliposomes with chitosan coating is a suitable solution to improve its physical and antibacterial properties. In such a way that by increasing the concentration of chitosan in the coating, both of the aforementioned properties improved significantly. Nanoliposomes carrying nisin with (and without) chitosan coating have the ability to inhibit the growth and killing *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The antibacterial activity increases with the increase in nisin and carrier nanoliposomes concentrations. The value of non-growth halo, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration confirm that *Bacillus cereus* is more resistant to nisin and its carrier nanoliposomes than *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Nisin, Nanoliposome, Chitosan, Physical properties**,** Antibacterial activity.

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۷۳-۵۶۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 561- 573

مقاله کوتاه علمی-پژوهشی

تولید نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با پوشش کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی محصول علیه *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*

سهیل ریحانی پول[1]*- سکینه یگانه[2]- رضا صفری[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۴

چکیده

از آنجا که فعالیت ضدباکتریایی نایسین در واکنش با پروتئین‌ها، قندها و لیپیدها کاهش می‌یابد، نانوریزپوشانی این نگهدارنده جهت حفاظت از خواص ذاتی آن راه حل مناسبی به‌نظر می‌رسد. هدف تحقیق حاضر تولید نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی محصول بود. به همین منظور چهار تیمار شامل NN (نانولیپوزوم‌های حامل نایسین)، NN-CH (0.05)، NN-CH (0.1) و NN-CH (0.5) (نانولیپوزوم‌های حامل نایسین به‌ترتیب با پوشش‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد کیتوزان) طراحی و مورد آزمون‌های مختلف قرار گرفتند. نتایج نشان داد میانگین سایز ذرات در تیمارهای مختلف از حدود ۱۱۰ تا ۳۲۷ نانومتر متغیر است؛ ضمن اینکه با افزایش میزان کیتوزان در پوشش، ذرات بزرگتر شدند (P<۰/۰۵). شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارها کمتر از ۰/۳ ثبت شد و ارتباطی با میزان کیتوزان در پوشش نداشت. با افزایش میزان کیتوزان اطراف نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا به صورت معنی داری افزایش (P<۰/۰۵) و از ۵۵/۳۴- در تیمار NN به ۵۳/۱۴ میلی‌ولت در تیمار NN-CH (0.5) ارتقا یافت. همچنین راندمان ریزپوشانی نیز به صورت معنی داری بیشتر شد و از ۳۲/۱۹ در تیمار NN به ۷۵/۱۴ درصد در تیمار NN-CH (0.5) تغییر کرد (P<۰/۰۵). مطابق نتایج فعالیت ضدباکتریایی نایسین در دو روش انتشار در محیط کشت آگار و رقیق‌سازی در لوله، با نانوریزپوشانی نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان، فعالیت ضدباکتریایی آن بیشتر شد (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش غلظت کیتوزان، فعالیت ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل افزایش یافت و بیشترین حد آن در تیمار NN-CH (0.5) ثبت گردید (P<۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد *باسیلوس سرئوس* در برابر تیمارهای تحقیق (با پنج غلظت ۲/۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از حدود ۴/۵ تا ۱۷/۵ میلی‌متر متغیر بود. این میزان برای *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۲/۱ تا ۲۶/۵ میلی‌متر ثبت شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تیمارهای تحقیق برای *باسیلوس سرئوس* به‌ترتیب در بازه ۱۰۰ تا ۴۰۰ و ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت. این دو غلظت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب ۵۰ تا ۲۰۰ و ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید. مطابق یافته‌ها، نانوریزپوشانی نایسین در قالب نانولیپوزوم‌های حامل با پوشش کیتوزان موجب ارتقای خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نایسین، نانولیپوزوم، کیتوزان، خواص فیزیکی، فعالیت ضدباکتریایی.

مقدمه

نایسین که امروزه به صورت گسترده در فراورده‌های غذایی به عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود، در حقیقت نوعی باکتریوسین است که دارای ۳۴ اسیدآمینه و وزن مولکولی معادل ۳/۵ کیلودالتون می‌باشد. باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*[4] این ترکیبات را به‌منظور حفظ بقا و پیروزی در رقابت بر سر منابع تولید می‌کنند (Da Silva Malheiros et al., 2010; Hamidi et al., 2012). باکتریوسین‌ها که دارای ماهیت پپتیدی یا پروتئینی ضدمیکروبی هستند (Chollet et al., 2008) به دلیل مقاومت در برابر دماهای بالا و پائین، اسیدیته بالا، نمک‌ها، آنزیم‌ها و حلال‌های آلی ضعیف، قابلیت استفاده در فراورده‌های غذایی مختلف را دارا می‌باشند(Cheikh et al., 2008 ; Zaerzadeh et al., 2011). نایسین معروف‌ترین باکتریوسینی است که هم از نظر علمی و هم از نظر اقتصادی بسیار مورد توجه است. به گونه‌ای که سازمان و غذا و داروی ایالات متحده بیش از ۲۲ سال

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: soheylreyhani@gmail.com

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.72715.1097

4 *Lactococcus lactis*

قبل و پس از آن اتحادیه اروپا آن را به‌عنوان نگهدارنده‌ای ایمن در صنایع غذایی تائید کرده است. به همین دلیل امروزه در بیش از ۵۰ کشور دنیا، این ماده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از دیگر نگهدارنده‌هایی که استفاده از آن در مواد غذایی به خصوص فراورده‌های شیلاتی مورد بحث و تحقیق است، کیتوزان می‌باشد (Nowzari et al., 2013; Ojagh et al., 2010; Alboghbeish and Khodanazari, 2017; Reyhani Poul and Jafarpour, 2020). کیتوزان پلیمر کربوهیدراتی است که در نتیجه حذف گروه استیل از کیتین حاصل می‌شود و اثرات ضدمیکروبی آن تائید شده است (No et al., 2003). در تحقیقاتی هم استفاده از کیتوزان جهت پوشش نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فعال به‌منظور بهبود خواص فیزیکی و پایداری محصول گزارش شده است (Bang et al., 2011; Yeganeh et al., 2018; Hasani et al., 2015; Li and Reyhani Poul, 2021). با همه مزایای نایسین، موانعی در راه اثربخشی و استفاده از آن به فرم آزاد در فراورده‌های لبنی و پروتئینی وجود دارد. یکی از این موانع ترکیب نایسین با چربی، پروتئین و قندها و متعاقبا کاهش فعالیت ضدباکتریایی آن است. در علوم و صنایع غذایی در چنین مواقعی استفاده از تکنیک کپسوله کردن و تولید لیپوزوم بهترین راهکار ممکن است (Benech Laridi et al., 2003 et al., 2002). همچنین پوشش لیپوزوم‌ها با یک ترکیب ضدمیکروب مانند کیتوزان، احتمالا بر فعالیت ضدباکتریایی محصول می‌افزاید (Reyhani Poul and Jafarpour, 2020).

لیپوزوم‌ها ویزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها هستند که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای ایجاد می‌کنند (Ghorbanzadeh et al., 2017). این ساختارها اولین بار در اواسط دهه ۱۹۶۰ معرفی شدند. لیپوزوم‌ها دارای دم آبگریز و ناحیه سر آب دوست هستند. هنگامی که دو غشای منفرد به هم نزدیک می‌شوند، دم‌های آبگریز به یکدیگر جذب می‌شوند، در حالی که سر آب دوست هر دو غشا به سمت آب قرار می گیرند. این فرایند، لایه مضاعف یا دو تایی کروی از مولکول‌های فسفولیپید را تشکیل می‌دهد. این کره فسفولیپیدی می‌تواند محلول‌های آبی را درون خود نگه داشته و حمل کند. لیپوزوم‌ها خاصیت آمفیفیلیک (دوگانه‌دوستی) دارند؛ لذا قادر به کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل هستند (Hasani et al., 2018). این خاصیت موجب می‌شود تا لیپوزوم‌ها بتوانند هر دو اسیدهای آمینه‌های قطبی و غیرقطبی را کپسوله کنند (Sadeghian et al., 2019). انواع مختلفی از ترکیبات زیست فعال آب‌دوست از جمله مولکول‌های کوچک و یون‌ها (نمک‌ها، قندها و پپتیدها)، پلیمرهای زیستی (پروتئین و پلی‌ساکاریدها) و ذرات (قطرات چربی، نانوذرات و پروبیوتیک‌ها) می‌توانند از طریق فاز آبی لیپوزوم‌ها حمل شوند. تاکنون در مطالعات مختلف، ترکیبات و عناصر مختلفی از جمله ویتامین‌های C، A، D و E، کارتنوئیدها، کوآنزیم کیو۱۰، آهن و کلسیم در سیستم‌های مبتنی بر لیپوزوم کپسوله شده‌اند (Xia et al., 2006, Tan et al., 2013). نانولیپوزوم‌ها همان لیپوزوم‌هایی با اندازه کوچکتر هستند که از نظر ساختاری و شیمیایی با لیپوزوم‌ها یکسان هستند. در صنایع غذایی از نانولیپوزوم‌ها جهت حفاظت از ترکیبات مختلف مانند نگهدارنده‌های ضدمیکروبی و قارچی و همچنین پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌شود (Yeganeh and Reyhani Poul, 2021). همچنین نانولیپوزوم‌ها برای کپسوله کردن برخی طعم‌دهنده‌ها و آنزیم‌ها با هدف رهایش تدریجی آن‌ها در محصولات غذایی نیز به‌کار می‌روند. ریزپوشانی آنزیم‌ها در نانولیپوزوم‌ها موجب کاهش از دسترفتن فعالیت آنزیم در شرایط شبیه‌سازی شده معده می‌شود (Hsieh et al., 2002). کپسوله کردن ترکیبات فنولی با نانولیپوزوم، پایداری آن‌ها را بهبود می‌دهد (Fang et al., 2010). نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها به‌واسطه اندازه کوچکتر (در حد نانو) سطح بیشتری را فراهم می‌کنند که این مورد موجب افزایش حلالیت، دسترسی زیستی مطلوب‌تر، بهبود شرایط آزادسازی کنترل شده و پایداری کلوئیدی بالاتر محتوی می‌شود. همچنین اندازه بسیار کوچک نانولیپوزوم نسبت به لیپوزم از ایجاد کدورت در صورت استفاده در محلول‌ها جلوگیری می‌کند (Rasti et al., 2012). هدف تحقیق حاضر نانو ریزپوشانی نایسین با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم- کیتوزان و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی (فعالیت مهار باکتری‌های شاخص مواد غذایی) است.

مواد و روش‌ها

نایسین مورد استفاده در تحقیق حاضر (Valisin، Mayasan، ترکیه)، گلیسرول (با خلوص ۸۰ درصد) و کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (با درجه داستیلاسیون ۸۵- ۷۵ درصد) از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. همچنین فسفولیپید (لیپوید، درجه خلوص ۹۹ درصد، سیگما، آلمان) خریداری گردید. به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی محصول از دو باکتری شاخص مواد غذایی یعنی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد که از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شدند. همچنین محیط کشت آگار مغذی و آبگوشت مغذی از شرکت بیولب هندوستان تهیه گردیدند.

تهیه نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با پوشش کیتوزان

نایسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و فسفولیپید/کلسترول در آب مقطر حل شدند. این محلول پس از اختلاط با گلیسرول تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارات داده شد. pH مخلوط با استفاده از

سود ۲ مولار (در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد و شیکر به مدت ۱ ساعت) به ۷/۳ رسانده شد. لیپوزوم‌های خام تحت فشار بالا هموژن شده و با نسبت‌های مختلفی از محلول کیتوزان (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد وزنی/ حجمی) مخلوط شدند (در دمای اتاق به مدت یک ساعت و با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه). لازم به ذکر است که محلول کیتوزان با حل کردن کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد وزنی/ وزنی تهیه شد. در مرحله بعد، محلول لیپوزومی در دمای اتاق با سونیکاتور (با پروپ ۲۰۰ یوپی‌اس) تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نهایتا محصول تولیدشده در دمای محیط در معرض گاز نیتروژن نگهداری شدند (Rasti et al., 2012). تیمارهای تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- تیمارهای تحقیق

Table 1- Research treatments

Treatments	Contents
NN	Nanoliposomes carrying nisin (no chitosan)
NN-CH (0.05)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.05% (W/V) chitosan coating
NN-CH (0.1)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.1% (W/V) chitosan coating
NN-CH (0.5)	Nanoliposomes carrying nisin with 0.5% (W/V) chitosan coating

ارزیابی خواص فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین میانگین سایز ذرات، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای[1] و پتانسیل زتا

شاخص‌های اندازه ذره‌ای و پراکندی ذرات پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی (PBS) به روش تفرق نور پویا[2] با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، Malvern، انگلستان، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به‌منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. در این روش نانولیپوزوم‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH= ۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم- تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (Hasani et al., 2018).

بازده ریزپوشانی

جهت محاسبه بازده فرایند ریزپوشانی، در مرحله اول ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر وارد اپندورف تیوپ شد. سپس این مخلوط با دور سریع rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت جداسازی گردید. در مرحله بعد، میزان پروتئین در فاز زیرین (رسوب) با استفاده از کیت اندازه‌گیری پروتئین پروگالول رد[3] مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین‌ها در حضور پروگالول رد و مولبدات کمپلکس قرمزی تشکیل می‌دهند که این رنگ توسط دستگاه اتوآنالیزور قابل اندازه‌گیری است. نهایتا بازده ریزپوشانی با استفاده از رابطه زیر محاسبه و به صورت درصد بیان شد (Watanabe et al., 1986, Zaerzadeh et al., 2011).

(۱) ۱۰۰ × (میزان اولیه نایسین / میزان نایسین اندازه‌گیری شده در نانولیپوزوم) = بازده ریزپوشانی (٪)

بررسی خواص ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین

به‌منظور ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی تیمارهای تحقیق از ۵ غلظت ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دو روش انتشار در محیط کشت آگار و رقیق‌سازی در لوله[4] و دو گونه *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد.

شرایط کشت باکتری‌های مورد استفاده

محیط کشت مورد استفاده به‌منظور آماده‌سازی باکتری‌ها، آبگوشت اینفیوزن مغز و قلب گاو[5] بود. پس از کشت اولیه باکتری‌ها، نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد، جهت دستیابی به رسوب باکتریایی، محیط‌های کشت حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از خارج‌کردن مایع رویی و افزودن بافر فسفات به رسوب باقیمانده، فرآیند سانتریفوژ دو بار دیگر تکرار گردید. در هر مرحله نیز از بافر فسفات جهت خارج کردن اثرات محیط آبگوشت اولیه استفاده گردید. سپس به رسوب باقیمانده مقداری بافر فسفات اضافه و با لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (معادل $۱/۵ \times ۱۰^۸$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) مقایسه شد.

1 Particle Dispersity Index
2 Dynamic Light Scattering
3 Pyrogallol red
4 Microdilution test
5 Brain Heart Infusion broth

نهایتا با رقیق‌سازی نمونه‌ها، رقت ۶-۱۰× ۱ به‌منظور انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرارگرفت (Sarada et al., 1999).

روش انتشار در محیط کشت آگار

در این روش، ابتدا سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری‌ها به صورت سطحی بر روی محیط کشت مولر هینتون[1] آگار کشت داده شد. در مرحله بعد، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در سطح محیط تعبیه و مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ ، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تیمارها به چاهک‌ها منتقل گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. از آنتی‌بیوتیک داکسی سیلین[2] (۳۰ میلی گرمی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Sitohy et al., 2015, Safari et al., 2018).

روش رقیق‌سازی در لوله

به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی تیمارهای تحقیق با روش رقیق‌سازی، رقت‌های مورد استفاده، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم بودند که به همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط آبگوشت اینفیوژن قلب و مغز گاو به لوله آزمایش منتقل شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد مطالعه به لوله‌ها اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. به‌منظور بررسی تغییرات حاصله، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. مانند روش قبلی، آنتی‌بیوتیک داکسی‌سیلین نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این روش، غلظتی از سوسپانسیون میکروبی که کمترین جذب نوری را نشان داد به‌عنوان کمترین غلظت مهارکننده باکتری[3] و غلظتی از سوسپانسیون که بعد کشت ۲۴ ساعته، فاقد رشد کلنی در محیط کشت بود نیز به‌عنوان کمترین غلظت کشنده باکتری[4] تعیین شد (Safari et al., Sitohy et al., 2015 ; 2018).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به‌منظور آنالیز آماری و رسم اشکال به‌ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و EXEL استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه آنالیز شدند و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

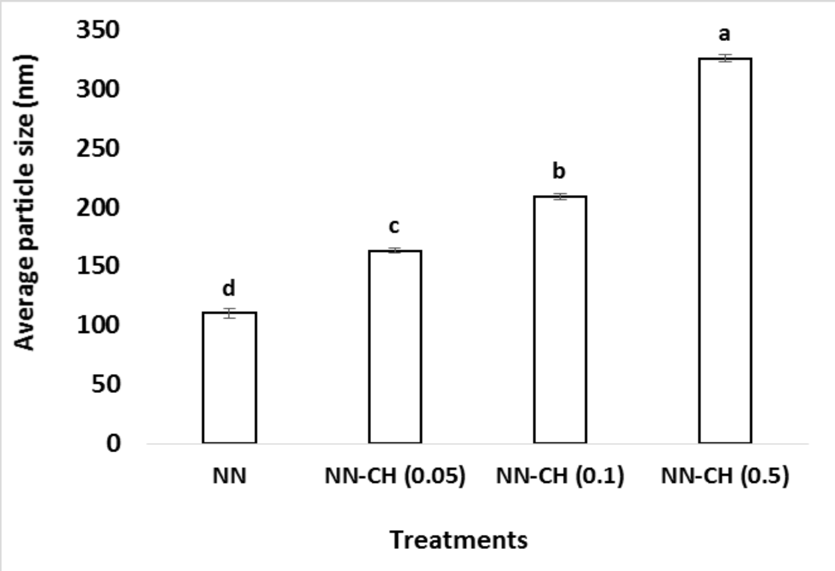
میانگین اندازه ذرات

اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین خواص فیزیکی سیستم‌های پوششی بر پایه نانولیپوزوم است که بر سایر ویژگی‌ها از جمله پایداری، راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات زیست‌فعال اثرگذار است (Hasani et al., 2018). شکل ۱، میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها را نشان می‌دهد. مطابق این شکل میانگین اندازه ذرات تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) و از حدود ۱۱۰ تا ۳۲۷ نانومتر متغیر هستند. میانگین اندازه نانولیپوزوم‌ها با افزایش میزان کیتوزان در پوشش اطراف آن‌ها، افزایش یافت و بیشترین میانگین سایز ذرات در تیمار NN-CH (0.5) ثبت شد (۳/۰۸ ±۳۲۶/۱ نانومتر).

در تحقیق پیش‌رو، پوشش نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان بر میانگین اندازه ذرات به شکل معنی‌داری افزود به‌گونه‌ای که میانگین اندازه ذرات از ۱۱۰/۵ نانومتر در نانولیپوزوم فاقد پوشش به ۳۲۶/۱ نانومتر در نانولیپوزوم دارای پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد افزایش یافت. این مورد با نتایج Sadeghian و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد. تحقیق آن‌ها که به بررسی خواص نانولیپوزوم‌های حامل پروتئین آبکافت شده دانه کینوآ پرداخت، گزارش کرد میانگین اندازه ذرات از ۴۰ نانومتر در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به ۷۰ نانومتر در نانولیپوزوم‌های دارای پوشش کیتوزان افزایش یافت (Sadeghian et al., 2019). همچنین در پژوهش دیگری که پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در قالب نانولیپوزوم کپسوله شدند، با افزایش میزان کیتوزان در اطراف نانولیپوزوم‌ها، ذرات به شکل معنی‌داری بزرگتر شدند؛ به‌گونه‌ای که میانگین اندازه آن‌ها از ۱۶۳/۴ نانومتر در نمونه‌های فاقد پوشش به ۲۳۴ نانومتر در تیمارهای داری پوشش کیتوزان یک درصد افزایش یافت (Ramezanzade et al., 2017). علت افزایش سایز ذرات تیمارها با افزودن کیتوزان، اتصال موفقیت‌آمیز کیتوزان به سطح نانولیپوزوم‌ها است که موجب شکل‌گیری لایه‌ای بر سطح ذرات و افزایش ضخامت و سایز آن‌ها می‌شود (Henriksen et al., 1994). البته در تحقیقاتی هم پوشش نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان موجب کاهش اندازه ذرات شده است (Bang et al., 2014, Hasani et al., 2018). Bang و همکاران (۲۰۱۴) علت این پدیده را نیروی انقباض ناشی از مقاومت یونی بین نانولیپوزوم‌های حامل و پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان بیان کردند؛ به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت کیتوزان، نیروی انقباضی افزایش

---
[1] Muller-Hinton Agar
2 Doxycycline
3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
4 Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

می‌یابد و موجب کاهش بیشتر در اندازه ذرات می‌گردد (Bang et al., 2014).

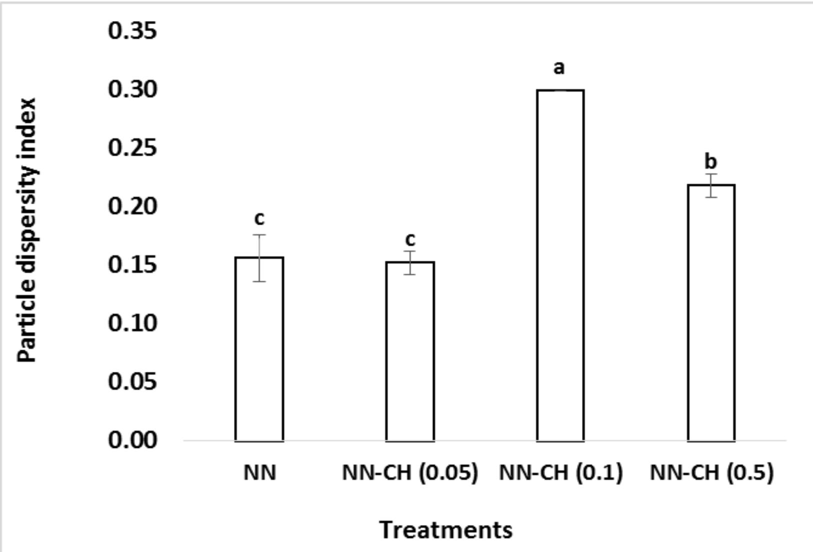


شکل ۱- میانگین سایز ذرات تیمارهای تحقیق

Fig. 1. Average particle size of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).



شکل ۲- شاخص توزیع اندازه ذره‌ای تیمارهای تحقیق

Fig. 2. Particle dispersity index of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).

شاخص توزیع اندازه ذره‌ای

شاخص توزیع اندازه ذره‌ای یکی دیگر از خواص فیزیکی نانولیپوزوم‌ها است که نشان‌دهنده حد و میزان یکنواختی سیستم‌های کلوئیدی می‌باشد. مقادیر بالای این شاخص بیانگر وجود ذرات و توده‌های درشت و غیریکنواخت در سیستم است (Romero-Pérez et al., 2010). در شکل ۲ شاخص توزیع اندازه ذره‌ای نانولیپوزوم‌ها ارائه شده است. مطابق این شکل شاخص مذکور از حدود ۰/۱۵۶ تا ۰/۳ در تیمارها متفاوت و بیشترین میزان آن (۰/۰۰ ±۰/۲۹۹) در

تیمار (0.1) NN-CH ثبت شد. این شاخص در تیمارهای NN و (0.05) NN-CH فاقد اختلاف معنی‌داری بود (P>۰/۰۵). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، رابطه معنی‌داری بین میزان کیتوزان در پوشش‌ها و شاخص مذکور وجود ندارد. میزان شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارهای تحقیق حاضر کمتر از ۰/۳ است که نشان‌دهنده یکنواختی توزیع ذرات است. شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تحقیقی که پپتیدهای حاصل از کلاژن ماهی[1] در سیستم نانولیپوزومی کپسوله شده بود، ۰/۲۵ گزارش شد (Mosquera et al., 2014). در تحقیقی که پپتیدهای آنتی‌اکسیدان حاصل از عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر[2] با استفاده از فسفاتیدیل کولین در ساختار لیپوزوم ریزپوشانی شدند، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای در تیمارها کمتر از ۰/۳ ثبت شد (Zavareze et al., 2014).

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا یکی دیگر از خواص فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی و بهترین شاخص از وضعیت الکتریکی سطحی این سیستم‌ها است. در واقع پتانسل زتا تعیین کننده ویژگی الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها و نشان‌دهنده بار کلی ذره در یک محیط مایع می‌باشد (Sadeghian et al., 2019). شکل ۳ پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، میزان این شاخص در نانولیپوزوم‌ها (تیمارها) از حدود ۵۵- تا ۵۴+ متغیر است. با افزایش مقدار کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتای سطح ذرات به شکل معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بیشترین سطح این شاخص در تیمار NN-CH (0.5) ثبت شد (۳/۲۵ ±۵۳/۱۴ میلی‌ولت).

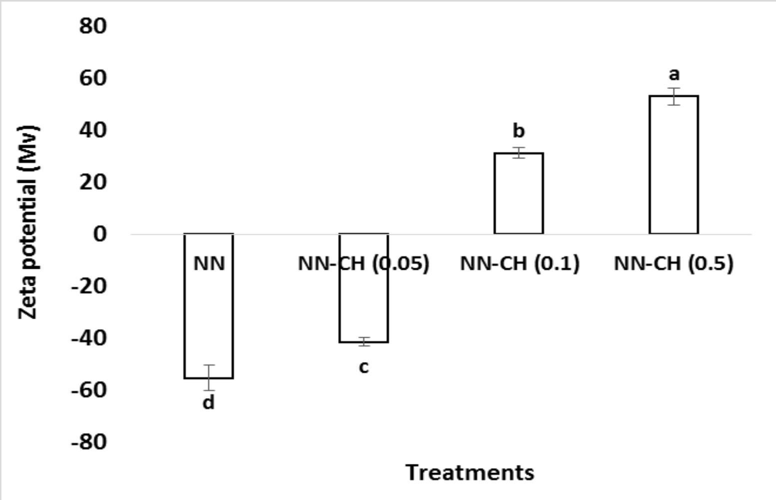
پتانسل زتا تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب ذرات، محیط پراکنش، pH و قدرت یونی در محلول تغییر می‌کند (Zavareze et al., 2014). این شاخص نمایانگر میزان تجمیع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک سیستم است (Hasani et al., 2018). اگر پتانسیل زتا به کمتر از مقدار بحرانی کاهش یابد، لایه دوگانه اطراف ذرات تخریب و متعاقبا تجمیع ذرات (توده‌ای شدن) اتفاق می‌افتد. اما اگر پتانسیل زتا به مقادیر استاندارد (ذراتی که پتانسل زتای آن‌ها بیشتر از ۳۰+ و یا کمتر از ۳۰- باشد، بیشترین پایداری را دارند) ارتقا یابد، ذرات همدیگر را دفع می‌کنند که این امر مانع از توده‌ای شدن می‌گردد. به همین دلیل ارزیابی پتانسل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌های حامل ترکیبات فعال و در نتیجه پایداری سیستم مفید و مهم است (Mozafari et al., Hasani et al., 2018, 2006). در تحقیق حاضر با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا به صورت معنی‌داری افزایش یافت و از ۵۵/۳۴- میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش به ۵۳/۱۴ میلی‌ولت در تیمار دارای پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان تغییر کرد. این مورد با نتایج تحقیق Ramezanzade و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد. در پژوهش مذکور پتانسل زتا از ۳/۹+ میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش کیتوزان (حامل پپتید) به ۴۵/۵ میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان ۱ درصد ارتقا یافت. این موارد نشان می‌دهد که کیتوزان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید کاتیونی قادر است پتانسیل زتا را به سمت مقادیر مثبت سوق دهد (Sadeghian et al., 2019).

بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی که نشان‌دهنده قدرت نانولیپوزوم در جلوگیری از خروج محتویات خود (هسته درونی) است، یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها در تعیین سطح پایداری (فیزیکی) ترکیبات کپسوله‌شده است (Hasani et al., 2018). همچنین این شاخص، سایر خصوصیات نانولیپوزوم‌ها از جمله پایداری اکسیداتیو، مورفولوژی و میزان رهایش را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (Drusch et al., 2012). شکل ۴ بازده فرایند ریزپوشانی تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. مطابق این شکل هر چهار تیمار از نظر شاخص مذکور اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵). با افزایش میزان کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، بازده ریزپوشانی به صورت معنی‌داری در تیمارها بیشتر شد (P<۰/۰۵)؛ به گونه‌ای که این شاخص از ۳۲/۱۹ درصد در تیمار نانولیپوزوم فاقد پوشش (NN) به ۷۵/۱۴ درصد در تیمار نانولیپوزوم پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان ۰/۵ درصد ((NN-CH (0.05)) افزایش یافت. در سایر تحقیقات نیز نتیجه مشابهی گزارش شد (Zavareze et al., 2014 ; Liu et al., 2015). در تحقیقی که پپتید حاصل از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در قالب نانولیپوزوم کپسوله شد، افزایش میزان کیتوزان در پوشش به ۰/۲ و ۰/۴ درصد موجب افزایش راندمان ریزپوشانی شد؛ به‌گونه‌ای که شاخص مذکور از ۶۸/۵ درصد در تیمارهای فاقد پوشش به‌ترتیب به ۷۳/۵ و ۸۰/۲ درصد در تیمارهای پوشش‌دار ارتقا یافت. اما وقتی میزان کیتوزان به ۰/۸ و ۱ درصد افزایش داده شد، روند کاهشی بازده ریزپوشانی ثبت گردید (Ramezanzade et al., 2017).

---

1 *Bream scales*
2 *Micropogonias furnieri*

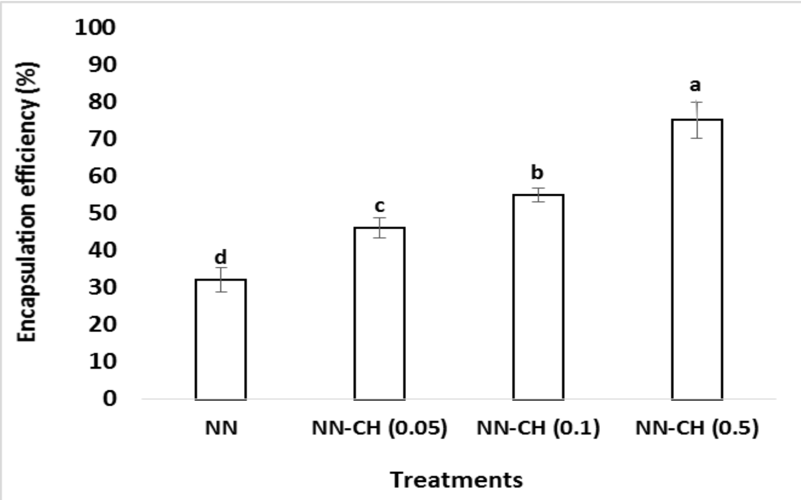


شکل ۳- پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها

Fig. 3. Zeta potential of nanoliposomes

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).



شکل ٤- بازده ریزپوشانی تیمارهای تحقیق

Fig. 4. Encapsulation efficiency of research treatments

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters indicates a significant difference between the data (p<0.05).

فعالیت ضدباکتریایی تیمارها

انتشار در محیط کشت آگار (قطر هاله عدم رشد)

جدول ۲ و ۳، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در برابر تیمارهای تحقیق (با پنج غلظت) نشان می‌دهند. مطابق این جداول، با نانو ریزپوشانی نایسین (تیمار NN)، قطر هاله عدم رشد هر دو باکتری به صورت معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). به این معنی که نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (بدون پوشش کیتوزان) فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به نایسین خالص دارند. این یافته موید آن است که تکنیک نانوریزپوشانی نایسین با پوشش نانولیپوزوم در افزایش فعالیت ضدباکتریایی این نگهدارنده دارای قابلیت مثبتی است. به‌طور کلی تکنیک نانوریزپوشانی در افزایش فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات فعال موثر است. در تحقیقی که فیکوسیانین (که یک رنگدانه ضدباکتریایی است) مستخرج از میکروجلبک اسپیرولینا[1] با پوشش

1 *Spirulina platensis*

مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانوریزپوشانی شد، چنین نتیجه‌ای تائید گردید (Safari et al., 2018).

همانطور که در جدول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، با اضافه شدن کیتوزان به نانولیپوزوم‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها نسبت به تیمار NN به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر شد (P<۰/۰۵)؛ ضمن اینکه در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان، با افزایش غلظت این پوشش پلی‌ساکاریدی، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها نیز افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها مربوط به تیمار NN-CH (0.5) بود. مطابق یافته‌ها، اختلاف دو تیمار NN-CH (0.05) و NN-CH (0.1) در این زمینه معنی‌دار نیست (P>۰/۰۵). نتایج این بخش نشان می‌دهد که کیتوزان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید ضدمیکروب (Paomephan et al., 2018) در ترکیب با نایسین (نانولیپوزوم‌های حامل)، می‌تواند فعالیت ضدباکتریایی آن را ارتقا دهد. نتایج تحقیقی که طی آن پپتیدهای زیست فعال میگو با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم- کیتوزان نانوریزپوشانی شدند (Yeganeh and Reyhani Poul, 2021) نشان داد که نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال با پوشش منفرد نانولیپوزوم، فعالیت مهارکنندگی پپتیدها را ارتقا نمی‌دهد که این یافته بر خلاف نتیجه تحقیق حاضر است. اما پژوهش پیش رو از جهت افزایش فعالیت ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌های حامل نایسین با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش، با تحقیق مذکور همخوانی دارد.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در برابر نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (میلی‌متر)

Table 2- Diameter of the non-growth halo of *Bacillus cereus* bacteria against nanoliposomes carrying nisin (mm)

Treatments	Concentrations (µg/ml)					Positive control
	2.5	5	10	20	25	Doxycycline
N	R	R	3.56±0.08^{Cd}	6.72±0.15^{Bd}	9.43±0.29^{Ad}	23.11±0.37
NN	R	R	4.82±0.11^{Cc}	8.36±0.14^{Bc}	11.25±0.55^{Ac}	
NN-CH (0.05)	R	4.56±0.12^{Db}	6.58±0.19^{Cb}	9.98±0.37^{Bb}	14.74±0.36^{Ab}	
NN-CH (0.1)	R	4.64±0.15^{Db}	6.73±0.1^{Cb}	10.15±1.04^{Bb}	14.97±0.11^{Ab}	
NN-CH (0.5)	R	7.48±0.24^{Da}	8.62±0.21^{Ca}	12.87±0.42^{Ba}	17.11±0.38^{Aa}	

R= Resistance

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در سطر و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different uppercase and lowercase letters in rows and columns, respectively, indicate significant differences between the data (p<0.05).

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر نانولیپوزوم‌های حامل نایسین (میلی‌متر)

Table 3- Diameter of the non-growth halo of *Staphylococcus aureus* bacteria against nanoliposomes carrying nisin (mm)

Treatments	Concentrations (µg/ml)					Positive control
	2.5	5	10	20	25	Doxycycline
N	2.14±0.06^{Dd}	2.25±0.1^{Dd}	5.76±0.12^{Cd}	8.46±0.11^{Bd}	12.81±0.77^{Ad}	31.11±0.37
NN	3.11±0.12^{Dc}	3.12±0.04^{Dc}	7.39±0.24^{Cc}	11.85±0.82^{Bc}	14.47±0.63^{Ac}	
NN-CH (0.05)	3.96±0.19^{Db}	3.99±0.21^{Db}	10.35±0.43^{Cb}	14.31±1.06^{Bb}	19.12±1.23^{Ab}	
NN-CH (0.1)	4.11±0.83^{Db}	4.11±0.57^{Db}	10.69±0.56^{Cb}	14.55±0.74^{Bb}	19.25±0.94^{Ab}	
NN-CH (0.5)	6.43±0.1^{Da}	6.61±0.25^{Da}	12.81±0.64^{Ca}	18.11±1.01^{Ba}	26.34±1.01^{Aa}	

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در سطر و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (P<۰/۰۵).

Different uppercase and lowercase letters in rows and columns, respectively, indicate significant differences between the data (p<0.05).

مطابق جدول ۲ و ۳، قطر هاله عدم رشد باکتری *باسیلوس سرئوس* در پنج غلظت از حدود ۴/۵ تا ۱۷/۵ میلی‌متر متغیر است. این میزان برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۲/۱ تا ۲۶/۵ میلی‌متر بود. مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف تیمارها نشان داد که با افزایش غلظت، فعالیت ضدباکتریایی (تیمارها) به‌صورت معنی‌داری بیشتر می‌شود (P<۰/۰۵). البته استثناهایی هم در این زمینه وجود دارد. قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو غلظت ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمارهای تحقیق یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). در ادامه مشخص شد، باکتری *باسیلوس سرئوس* در برابر غلظت ۲/۵

میکروگرم بر میلی‌لیتر همه تیمارهای تحقیق مقاوم است. این مقاومت در برابر نایسین خالص (تیمار N) و نانولیپوزوم‌های حامل آن (بدون پوشش کیتوزان یا تیمار NN) در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز ثبت شد. اما چنین مقاومتی در هیچ کدام از غلظت‌های نانولیپوزوم‌های حامل برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نشد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان ادعا کرد که مقاومت *باسیلوس سرئوس* در برابر نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن با (بدون) پوشش کیتوزان بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

رقیق‌سازی در لوله (MIC و MBC)

مطابق جدول ۴، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن با (بدون) پوشش کیتوزان برای باکتری *باسیلوس سرئوس* به‌ترتیب در بازه ۱۰۰ تا ۴۰۰ و ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار دارد. این دو غلظت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب ۵۰ تا ۲۰۰ و ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شدند. نتایج فعالیت ضدباکتریایی به روش رقیق‌سازی در لوله نشان داد که مقادیر MIC و MBC برای باکتری *باسیلوس سرئوس* در سطح بالاتری نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار دارند. بنابراین یافته‌های این بخش هم، مانند قطر هاله عدم رشد موید آن است که باکتری *باسیلوس سرئوس* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر تیمارهای تحقیق از مقاومت بیشتری برخوردار است. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، با نانوریزپوشانی نایسین با پوشش منفرد نانولیپوزوم (تیمار NN)، MIC و MBC این تیمار (نسبت به نایسین خالص یا تیمار N) برای باکتری *باسیلوس سرئوس* کاهش یافت اما چنین کاهشی در مورد استافیلوکوکوس اورئوس ثبت نشد. همچنین در مورد هر دو باکتری، MIC و MBC دو تیمار NN-CH (0.05) و NN-CH (0.1) یکسان بود. ضمن اینکه کمترین میزان MIC و MBC در تیمار NN-CH (0.5) گزارش شد.

جدول ٤- حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده تیمارهای تحقیق برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 4- MIC and MBC of research treatments for *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (µg/ml)

Strain	Treatments	MIC	MBC
Bacillus cereus	N	400	500
	NN	200	400
	NN-CH (0.05)	200	400
	NN-CH (0.1)	200	400
	NN-CH (0.5)	100	200
Staphylococcus aureus	N	200	400
	NN	200	400
	NN-CH (0.05)	100	200
	NN-CH (0.1)	100	200
	NN-CH (0.5)	50	100

نتیجه‌گیری

نانوریزپوشانی نایسین در قالب نانولیپوزوم‌های حامل با پوشش کیتوزان راه حل مناسبی جهت ارتقای خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن است؛ به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش، هر دو خاصیت مذکور به صورت قابل ملاحظه‌ای بهبود می‌یابند. نانولیپوزوم های حامل نایسین با (و بدون) پوشش کیتوزان دارای قابلیت مهار رشد و همچنین حذف باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند که این قابلیت با افزایش غلظت بیشتر می‌شود. مقادیر قطر هاله عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی موید آن است که *باسیلوس سرئوس* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر نایسین و نانولیپوزوم‌های حامل آن مقاوم‌تر است.

منابع

1. Alboghbeish, H., and Khodanazary, A. (2017). Comparative effects of chitosan and nanochitosan coatings enriched with green tea (*Camellia sinensis* L.) extract on quality of Costal trevally fish (*Carangoides coeruleopinnatus*) during refrigerated storage. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *26* (5), 95-109. [In Persian].
2. Bang, S. H., Hwang, I. C., Yu, Y. M., Kwon, H. R., Kim, D. H., and Park, H. J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, *28*(7), 595-604.

3. Begde, D., Bundale, S., Mashitha, P., Rudra, J., Nashikkar, N., and Upadhyay, A. (2011). Immunomodulatory efficacy of nisin, a bacterial lantibiotic peptide. *Journal of Peptide Science*, *17*(6), 438-444. https://doi.org/10.1002/psc.1341
4. Benech, R. O., Kheadr, E. E., Laridi, R., Lacroix, C., and Fliss, I. (2002). Inhibition of Listeria innocua in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(8), 3683-3690.
5. Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, W., and Zhang, H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(3), 215-222. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.012
6. Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., and Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, *19*(10), 982-989. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.10.005
7. Da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L. M., ... and Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Science and Technology*, *59*(2), 841-848.
8. Da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., and Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(6), 284- 292. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.003
9. Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M. Q., Rätzke, K., Zaporojtchenko, V., and Schwarz, K. (2012). New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocolloids*, *27*(2), 332-338. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.001
10. Fang, Z., and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols–a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510-523. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003
11. Ghorbanzadeh, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., and Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, *216*, 146-152. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022
12. Hamidi, M., Mousavi Nasab, D., Ahmadi, N., Basati, Gh., Aolad, G., Salimian, J., and Zargar, M. (2012). Synthesis of antimicrobial peptides in bacteria. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *20* (4), 158-170. [In Persian].
13. Hasani, Sh., Shahidi, M., and Ojagh. M., (2018). The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Industry*, *8* (1), 31-44. [In Persian].
14. Henriksen, I., Smistad, G., and Karlsen, J. (1994). Interactions between liposomes and chitosan. *International journal of pharmaceutics*, *101*(3), 227-236. https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90218-6
15. Hsieh, Y. F., Chen, T. L., Wang, Y. T., Chang, J. H., and Chang, H. M. (2002). Properties of liposomes prepared with various lipids. *Journal of Food Science*, *67*(8), 2808-2813.
16. Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemard, J. C., Lacroix, C., and Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325-336. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2
17. Li, Z., Paulson, A. T., and Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, *19*, 733-743. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.058
18. Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., and Singh, H. (2015). Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry*, *175*, 16-24. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.108
19. Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., and Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, *156*, 144-150. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011
20. Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., and Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2038-2045. https://doi.org/10.1002/jsfa.2576
21. No, H. K., Lee, S. H., Park, N. Y., and Meyers, S. P. (2003). Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, *51*(26), 7659-7663.
22. Nowzari, F., Shábanpour, B., and Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *141*(3), 1667-1672. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.022

23. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *120*(1), 193-198. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006
24. Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N. C., Bergkvist, M., and Niamsiri, N. (2018). Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control*, *86*, 294-301. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.021
25. Ramezanzade, L., Hosseini, S. F., and Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, *234*, 220-229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.177
26. Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., and Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, *135*(4), 2761-2770. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.016
27. Reyhani Poul, S., and Jafarpour, A. (2020). Effect of edible active film of chitosan containing fish protein hydrolysate (FPH) on chemical and microbial properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during the refrigerated storage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *16* (4), 493-505. [In Persian].
28. Romero-Pérez, A., García-García, E., Zavaleta-Mancera, A., Ramírez-Bribiesca, J. E., Revilla-Vázquez, A., Hernández-Calva, L. M., ... and Cruz-Monterrosa, R. G. (2010). Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary Research Communications*, *34*(1), 71-79. https://doi.org/10.1007/s11259-009-9335-z
29. Sadeghian, Y., Sadeghi, A.R., Ghorbani, M., Alami, M., and Joshaghani, H. (2019). Investigation of the physical, chemical and antioxidant properties of nanoliposomes loaded with quinoa seed hydrolyzed proteins. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *15* (2), 71-82. [In Persian].
30. Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmaeilzadeh Kenari, R. (2018). Optimizing the extraction of phycocyanin pigment from *Spirulina platensis* algae and investigating the qualitative properties of the encapsulated pigment. PhD thesis, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. [In Persian].
31. Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G., and Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, *34*(8), 795-801. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00153-8
32. Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A. G. A., and Salama, A. (2015). Antibacterial phycocyanin from Anabaena oryzae SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, *8*(4), 27-36.
33. Tan, C., Xia, S., Xue, J., Xie, J., Feng, B., and Zhang, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(34), 8175-8184.
34. Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., and Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, *205*, 221-228. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002
35. Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., and Tokuda, K. (1986). Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clinical Chemistry*, *32*(8), 1551-1554.
36. Xia, S., Xu, S., and Zhang, X. (2006). Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6358-6366.
37. Yeganeh, S., and Reyhani Poul. (2021). Nanoencapsulation of bioactive peptides from shrimp wastes enzymatic hydrolysis with combined coating of nanoliposome -chitosan and evaluation of antibacterial, antioxidant and antihypertensive activity of the product. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *30* (6), 83-95. [In Persian].
38. Zaerzadeh, E., Mortazavi, A., Jafari, M., Afsharnejad, S., Tabatabaii, F., and Nassiri, M. (2011). Antibacterial effect of nanoencapsulated nisin in liposoms in contrast to free nisin in control of *Listeria monocytogenes* in iranian feta cheese (UF). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *7* (3), 191-199. [In Persian].